

NUEVOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN PARA PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

Gabriel A. Bó¹², Andrés Tríbulo¹³, Reuben J. Mapletoft⁴

¹Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural General Paz, (5145) Córdoba, Argentina;

²Instituto de Ciencias Básicas, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina

³Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

⁴Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá

E-mail: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Resumen

Hay una continua necesidad de simplificar los protocolos de superovulación y transferencia de embriones bovinos. El control de la emergencia de la onda folicular mediante el uso de estradiol y dispositivos de liberación de progesterona han facilitado la superovulación de las donantes. Sin embargo, el estradiol no se puede utilizar en muchas partes del mundo. Una alternativa para esto es la ablación folicular, pero la eliminación mecánica del folículo dominante mediante la punción guiada por ultrasonografía transvaginal es difícil de aplicar en el campo. Otras alternativas incluyen GnRH o LH, pero su eficacia para inducir ovulación en grupos de animales que se encuentran en distintos momentos del ciclo estral es variable. Sin embargo, se puede aumentar la respuesta ovulatoria a la GnRH mediante la inducción de un folículo persistente y de esta manera iniciar los tratamientos con FSH después de esta ovulación inducida por la GnRH. El número de embriones transferibles después de la superovulación durante la primera onda folicular sincronizada por la ovulación del folículo dominante fue similar al que se logró 4 días después del tratamiento con benzoato de estradiol y progesterona. Para simplificar aún más la superovulación, se puede administrar la FSH en una o dos inyecciones intramusculares. La superovulación de las donantes con una o dos ("Tratamiento Split") inyecciones de Folltropin-V diluido en una formulación de liberación lenta tuvo una producción de embriones comparable a la del protocolo tradicional de dos inyecciones por día. Los tratamientos de dosis Split de Folltropin-V tienen el potencial de reducir el trabajo y el manejo y puede ser una alternativa interesante para tratar animales en los cuales el estrés sea un impedimento para el éxito.

Palabras clave adicionales: ovulación, estradiol, progesterona, GnRH, FSH.

Introducción

La variabilidad en la respuesta a los tratamientos superovulatorios y el tiempo y esfuerzo necesarios para la administración de los tratamientos, han sido los principales factores que afectan la aplicación de la transferencia de embriones en programas de mejoramiento genético (Bó *et al.*, 2008). Si bien los avances en el conocimiento de los últimos años no ha podido aumentar significativamente el número de embriones transferibles que se producen en promedio por tratamiento superovulatorio, el desarrollo de protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular (Bó *et al.*, 1995; 2002a) y la ovulación (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006) han permitido la superovulación de grupos de donantes independientemente del momento del ciclo estral en que se encontraban y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) de ellas, sin la necesidad de detectar celos. Estos tratamientos han tenido un impacto positivo en la aplicación comercial de programas de transferencias embrionarias, porque han facilitado la programación de los protocolos de trabajo, sin ser tan dependientes del conocimiento y la habilidad del personal en la detección de celos. La intención de este trabajo es presentar avances realizados en el desarrollo de tratamientos de superovulación de donantes.

Manipulación de la onda folicular para la Superovulación

Tradicionalmente los protocolos de superovulación eran comenzados en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 a 11 después del celo (Lindsell *et al.*, 1986; Mapletoft y Pierson, 1993). Esto se debe a que en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza en promedio entre el día 9 y 10 del ciclo (Ginther *et al.*, 1989). Sin embargo trabajos posteriores han demostrado que la respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 o 2 días más tarde (Nasser *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 1994). Por lo tanto, el tratamiento convencional tiene dos inconvenientes: 1) requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100% efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado "celo Base" y 2) desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes a ser superestimuladas al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotropina.

En la década del 90 se desarrollaron tratamientos con progestágenos y esteroides de estradiol, que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 4 días después (Bó *et al.*, 1994b; 1995; 1996). Este tratamiento es utilizado por muchos profesionales alrededor del mundo (Beal, 1999; Mapletoft *et al.*, 2000; Bó *et al.*, 2006; Baruselli *et al.*, 2006), pero su uso ha sido restringido recientemente en países como USA, Nueva Zelandia y los de la Unión Europea, lo cual deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema (Lane *et al.*, 2008).

Esto creó la necesidad de desarrollar tratamientos que sincronicen el comienzo de una nueva onda folicular que no utilicen esteroides de estradiol. Un método alternativo ya descrito hace tiempo consiste en eliminar, por punción guiada por ultrasonografía, todos los folículos ≥ 5 mm y de esta manera, inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después (Bergfelt *et al.*, 1994). De esta manera se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante (Beal, 1999; Bungarts y Niemann, 1994; Kim *et al.*, 2001) ó de todos los folículos presentes en el ovario (Bergfelt *et al.*, 1997; Hill y Kuehner, 1996). El inconveniente que tiene este método es que hay que contar con un equipo de ultrasonografía y personal capacitado para realizar dicho trabajo, lo que hace que esta tecnología se adapte más a centros de producción de embriones, donde todas las donantes se encuentran concentradas en un solo lugar, que a la superovulación a campo, en establecimientos de distintos productores.

Otra alternativa es la utilización de GnRH o pLH para inducir la ovulación del folículo dominante (MacMillan y Thatcher, 1991) y así tener el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después (Pursley *et al.*, 1995); pero el comienzo de la onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en ovulación del folículo dominante (Martínez *et al.*, 1999). En vacas lecheras, los primeros trabajos con esta temática reportaron tasas de ovulación del folículo dominante del 85% después de la administración de GnRH (Pursley *et al.*, 1995), pero otros más recientes (Colazo *et al.* 2007b) reportaron un promedio de ovulación de 62,4 % después de la administración de LH porcina y un 44,3 % cuando se trataron con GnRH ($P < 0.01$). Otro estudio mostró un promedio de ovulación de 78 % y 56 % en vaquillonas tratadas con LH porcina o GnRH, respectivamente (Martínez *et al.*, 1999). La incidencia de ovulación en respuesta a la GnRH o LH en vacas de carne parecen ser similares a las vaquillonas (aproximadamente 60%, Colazo *et al.*, 2007a). Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación han resultado en menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular (Deyo *et al.*, 2001). No obstante, en un estudio reciente (Wock *et al.*, 2008), vacas lecheras ($n=411$) fueron superovuladas seguido del uso de GnRH o estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. Los animales tratados con GnRH recibieron un CIDR en días aleatorios del ciclo estral (Día 0), la GnRH fue inyectada el Día 3 y la superestimulación fue iniciada 48 h más tarde. Las otras donantes fueron superestimuladas 4 días después de la inserción de un CIDR y la administración 4 mg de estradiol-17 β . El análisis de los datos no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos tratados con estradiol ó GnRH en el número de ovocitos/embriones recuperados ($9,8 \pm 0,6$ vs. $9,7 \pm 0,7$), ni en los grado 1 y 2 ($4,7 \pm 0,4$ vs. $4,5 \pm 0,4$). Finalmente, en otro análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales en vacas lecheras (Steel y Hasler, 2009), hubo un grupo de donantes ($n=245$) que recibieron GnRH 1,5 días después de la inserción de un CIDR y 60 h antes del inicio del tratamiento con FSH que tuvieron una respuesta ($5,6 \pm 6,0$ embriones transferibles) que no difirió de las de donantes tratadas con estradiol-17 β ($n=691$; $6,1 \pm 6,2$ embriones transferibles). Sin embargo, las donantes con estradiol-17 β si tuvieron una respuesta mayor ($P < 0,05$) que las de vacas iniciadas entre los Días 7 a 14 del ciclo estral ($n=614$; $5,3 \pm 5,5$ embriones transferibles). Por lo tanto, estudios experimentales apropiadamente desarrollados y controlados eran necesarios para confirmar estos resultados.

Superovulación durante la primera onda folicular

Los tratamientos superestimuladores también pueden ser comenzados en el momento de emergencia de la primera onda folicular en vacas (Nasser *et al.* 1993) y ovejas (Menchaca *et al.*, 2002). Adams *et al.* (1994) reportaron además similares

respuestas superovulatorias entre tratamientos iniciados en el momento de la emergencia de la primera o segunda onda folicular. El punto es determinar el momento de la ovulación con ultrasonografía o iniciar los tratamientos un día después del comienzo del celo.

Para evitar la necesidad de observar la expresión de celo de las donantes, Nasser *et al.* (2003) indujeron una ovulación sincrónica en vacas Nelore (*Bos indicus*) utilizando un protocolo de CIDR y benzoato de estradiol (EB), con la administración de pLH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá) 24 h después de retirado el CIDR. Los tratamientos superestimuladores se iniciaron 24 h después de la pLH (en el momento esperado de la ovulación y consecuentemente la emergencia de la primera onda folicular). No hubo diferencias en el número de embriones transferibles en las vacas tratadas con CIDR cuando los tratamientos superestimuladores fueron iniciados en el momento de emergencia de la primera onda folicular ($8,0 \pm 1,8$) o 4 días después de la inyección de 2,5 mg de EB y 50 mg de progesterona (Grupo control: $6,6 \pm 2,0$); pero el número de embriones fue menor cuando las vacas fueron superestimuladas durante la primera onda pero sin la colocación de un CIDR durante el tratamiento ($0,2 \pm 0,2$; $P < 0,05$). Los resultados de este último grupo, sugieren que se requiere tener progesterona circulante para que los ovocitos tengan la capacidad de ser fertilizados y los embriones desarrollarse (Nasser *et al.*, 2011).

Recientemente, realizamos una serie de 5 experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación de la primera onda folicular, utilizando dispositivos con progesterona pero sin el uso de estradiol (Carballo *et al.*, 2008a, 2008b, 2009, 2010). Para desarrollar este protocolo nos basamos en los trabajos que han demostrado que es posible aumentar la respuesta ovulatoria a la GnRH mediante la inducción de un folículo persistente con el uso de un CIDR por 7 a 10 días y $PGF_{2\alpha}$ en el momento de inserción del CIDR (Small *et al.*, 2009). El protocolo resultante de estos trabajos (Figura 1), consiste en la inserción de un dispositivo con progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health, Canada) y una dosis de $PGF_{2\alpha}$ (en momentos no conocidos del ciclo estral de la donante), seguidos de una dosis de GnRH a los 7 días de la inserción del Cue-Mate. Esto resultó en una tasa de ovulación del folículo dominante del 89,2 % y la ovulación ocurrió a las $37,5 \pm 0,7$ horas de la GnRH (Carballo *et al.*, 2009). Por lo tanto, se inician los tratamientos con Folltropin-V a las 36 horas de la GnRH. Las donantes reciben Folltropin-V en 8 dosis decrecientes cada 12 horas y por 4 días, $PGF_{2\alpha}$ con las dos últimas dosis de Folltropin-V y el dispositivo Cue-Mate es removido con la última aplicación de Folltropin-V. Todas las donantes reciben 12,5 mg de pLH, 24 horas después del retiro del Cue-Mate y son inseminadas 12 y 24 horas más tarde. Los embriones son colectados 7 días después de la aplicación de pLH. La respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones no difirió de la obtenida con el tratamiento de superovulación utilizando EB+ P4 para sincronizar el desarrollo folicular (Carballo Guerrero *et al.*, 2010; Tabla 1)

Tabla 1. Respuesta superovulatoria (media \pm E.E.) de donantes de embriones Simmental pre-tratadas con Cue-Mates y una inyección de $PGF_{2\alpha}$ antes de la inducción de la ovulación (y sincronización de onda) con GnRH y donantes tratadas con Cue-Mates, P4 y EB para sincronizar la onda folicular (Adaptado de Carballo *et al.*, 2010)

Grupos de tratamiento	N	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones Gr. 1 y 2	Embriones Gr. 1, 2 y 3
GnRH	14	11,5 \pm 1,7	9,3 \pm 1,5	7,2 \pm 1,5	7,7 \pm 1,6
EB + P4	14	14,5 \pm 2,8	9,4 \pm 2,3	5,6 \pm 1,5	6,8 \pm 1,7
Valor P		0,8033	0,9220	0,5416	0,8547

Estos datos demuestran que la superestimulación de la primera onda folicular puede ser empleada en grupos de donantes, independientemente del momento del ciclo estral en que se encuentren y sin afectar la respuesta superovulatoria, sin la necesidad del uso de estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. El tratamiento recomendado esta esquematizado en la Figura 1.

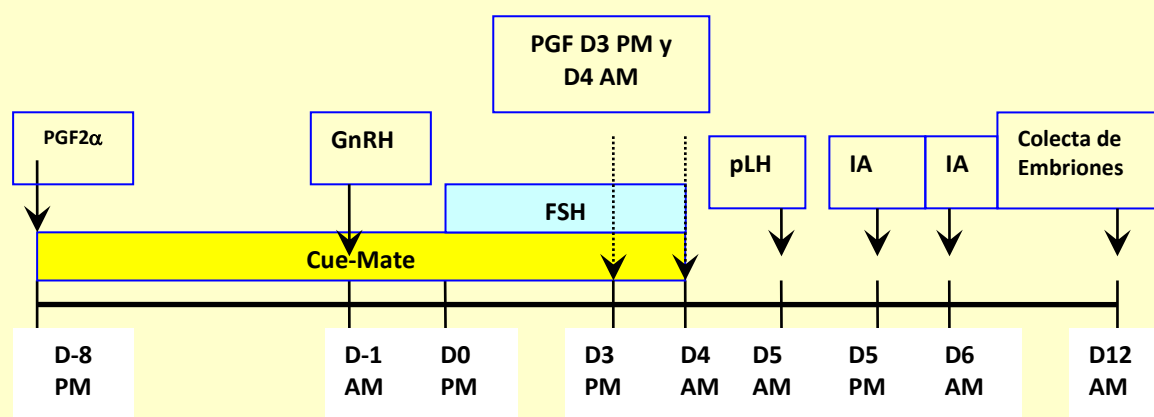


Figura 1. Tratamiento de sincronización de la ovulación para realizar la superestimulación durante la primera onda folicular en bovinos. Las donantes reciben un dispositivo liberador de progesterona (Cue-Mate) junto con una dosis de PGF_{2α} (Día -8) y una dosis de GnRH 7 días después (Día -1). En el Día 0 (36 h después de la GnRH) se comienza con el tratamiento con FSH en 8 dosis decrecientes administradas cada 12 h y por 4 días. Se administra PGF_{2α} con las dos últimas inyecciones de FSH y se retira el Cue-Mate con la última FSH. Luego se induce la ovulación con pLH a las 24 h de la remoción del Cue-Mate y las donantes son inseminadas 12 y 24 h después. Los embriones son colectados a los 7 días de la pLH.

Superovulación de vacas donantes utilizando una única dosis de FSH

Los tratamientos superestimuladores tradicionales, constan de una aplicación intramuscular de gonadotropina coriónica equina (eCG) o dos aplicaciones diarias cada 12 h durante 4 días de extractos pituitarios que contienen FSH (Mapletoft *et al.*, 1991). La eCG, es una glicoproteína que tiene una prolongada vida media (más de 40 h), lo que representa una ventaja desde el punto de vista práctico, dado que una sola aplicación es suficiente para provocar una apropiada estimulación ovárica (Schams *et al.*, 1977; Murphy y Martinuk, 1991). Sin embargo, una prolongada estimulación con eCG provoca un incremento en la cantidad de folículos anovulatorios en el momento de la colecta de embriones (González *et al.*, 1994a; 1994b). Contrariamente, la vida media de la FSH en la vaca es de 5 h (Laster, 1972; Demoustier *et al.*, 1988) y por eso se necesitan aplicaciones frecuentes para inducir una adecuada respuesta superovulatoria (Bellows *et al.*, 1969; Monniaux *et al.*, 1983). Tratamientos con dos aplicaciones diarias de FSH han demostrado mayor respuesta superovulatoria que tratamientos con una sola aplicación diaria (Looney *et al.*, 1981; Monniaux *et al.*, 1983; Walsh *et al.*, 1993).

La necesidad de inyectar dos veces por día hace que el tratamiento requiera máxima atención y resulta a veces muy difícil de aplicar en algunos establecimientos, dificultando aun más la posibilidad de que esta técnica sea utilizada masivamente. Además, cuando el tratamiento es aplicado incorrectamente las vacas no responden, o si se las trata bruscamente puede causar estrés en algunas donantes, con la consiguiente disminución de la respuesta superovulatoria (Bó *et al.*, 1991). Se ha reportado que el estrés por transporte disminuye la respuesta superovulatoria en vaquillonas (Edwards *et al.*, 1987). Además, el estrés agudo repetido puede alterar el pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982) y el uso de inyecciones de ACTH exógena, disminuyó significativamente la pulsatilidad de la LH (Ribadu *et al.*, 2000). Estos informes sugieren que en el ganado bovino, el estrés puede influir en la eficiencia de los tratamientos superovulatorios en animales indóciles o no tan acostumbrados a pasar frecuentemente por la manga. El desarrollo de un tratamiento superovulatorio con una sola aplicación de FSH no sólo ahorra tiempo y mano de obra, sino que también podría disminuir el estrés en las donantes de embriones, además de aumentar la precisión de los tratamientos en las explotaciones que carecen de personal capacitado.

En un estudio realizado hace más de 10 años, una sola dosis subcutánea de 400 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V en vacas de carne con una buena condición corporal (>3 en una escala del 1 al 5), resultó en una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo de tratamiento tradicional de dos aplicaciones al día durante 4 días (Bó *et al.*, 1994a). Sin embargo, los resultados no se pudieron repetir en vacas Holstein, que tenían menos tejido adiposo subcutáneo (Hockley *et al.*, 1992). En otro estudio realizado en vacas Holstein, la inyección única se dividió en dos, con un 75% de la dosis de Folltropin-V administrada por vía subcutánea en el primer día de tratamiento y el 25% restante fue administrado 48 horas después, cuando normalmente se administra la PGF_{2α} (Lovie *et al.*, 1994). La respuesta superovulatoria a este tratamiento fue intermedia entre la obtenida con el protocolo tradicional (la mayor respuesta) y la obtenida con una sola dosis subcutánea (la menor respuesta). En un estudio realizado por Brogliatti *et al.* (1996) se confirmaron los resultados del experimento anterior.

Una opción alternativa para inducir una respuesta superovulatoria con una única inyección de FSH, sería combinarla con agentes que resultan en una liberación lenta y sostenible de la hormona durante varios días. Estos agentes, son denominados comúnmente polímeros. Existen polímeros de origen biológico o sintético con diferentes propiedades utilizados en la liberación de drogas. Estos compuestos son biodegradables y no reaccionan en el tejido, lo que facilita su uso en animales (Sutherland, 1991). Nosotros hemos realizado recientemente una serie de experimentos (Tribulo *et al.*, 2010; Rogan *et al.*, 2010) para evaluar la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con una inyección única de Folltropin-V asociado con una formulación de liberación lenta a base de hialuronato de sodio (Bioniche Animal Health). Estos experimentos fueron realizados en donantes de varias razas de carne (Angus, Brangus, Bonsmara y Braford) para probar la efectividad de este protocolo (Tribulo *et al.*, 2010; Rogan *et al.*, 2010).

En el Día 0, todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol 17 β , 50 mg de progesterona y un dispositivo Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas con dos tratamientos: las vacas del Grupo Control recibieron Folltropin-V en dosis decrecientes por vía intramuscular cada 12 h durante 4 días, mientras que las vacas del Grupo Dosis Simple recibieron una dosis única de Folltropin-V diluida en 10 ml de hialuronato de Sodio (20 mg/ml) que fue aplicada por vía intramuscular en la tabla del cuello. En la mañana y la tarde del Día 6, todas las vacas recibieron PGF_{2 α} y se retiró el Cue-Mate en la tarde del Día 6. En la mañana del Día 8 las vacas recibieron 12,5 mg de pLH y fueron inseminadas 12 y 24 h más tarde (Día 9). Las vacas que mostraron celo en la tarde del Día 7, fueron inseminadas en el momento de la pLH y 12 h más tarde. Se colectaron los embriones en el Día 15 y fueron clasificados siguiendo las normas de la IETS. En el Día de la colecta, las donantes recibieron PGF_{2 α} , para ser nuevamente tratadas entre 13 y 20 días después (30 a 40 días de intervalo entre colectas). En la Tabla 2 se muestran resumidos los resultados obtenidos de los 7 experimentos realizados. No se encontraron diferencias significativas en el número y calidad de los embriones obtenidos.

Tabla 2. Respuesta superovulatoria (media \pm E.E.) en donantes de embriones tratadas con Folltropin-V administrada en 2 aplicaciones diarias durante 4 días (Control) o diluida en una solución de liberación lenta y administrada en una única aplicación (Dosis simple).

Grupos	n	Ovocitos/ embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones Gr. 1, 2 y 3
Control	175	12,1 \pm 0,6	8,5 \pm 0,5	6,4 \pm 0,4
Dosis simple	178	11,6 \pm 0,7	8,3 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5
Valor P		0,107	0,2346	0,5117

Como se muestra en la tabla, los resultados permiten afirmar que este protocolo es viable y efectivo para superestimular donantes de razas de carne. De las dosis de Folltropin-V evaluadas para cada raza, la que más embriones transferibles produjo en las donantes Angus (n=150) fue 300 mg (versus 200 y 400 mg); en las Brangus (n=41) no hubo diferencias entre 260 y 300 mg (versus 200 mg) y en la raza Bonsmara (n=74), no hubo diferencias entre 200 o 300 mg. En la raza Braford, sólo se utilizó las dosis de 260 mg (n=14).

Superovulación con dos inyecciones de FSH (Tratamiento "Split")

Aunque la dosis simple de Folltropin-V diluido en SRF fue altamente eficaz en la inducción de la superovulación, se considero que la concentración de SRF utilizada en estos experimentos era muy viscosa y el protocolo de dilución no tan fácil de utilizar por el personal de campo. Una reducción del 50 % en la concentración de SRF fue mucho menos viscosa y más fácil de mezclar con Folltropin-V, pero una sola inyección intramuscular resultó en una menor respuesta superovulatoria, presumiblemente debido a una absorción más rápida. La media de tamaño de los folículos en el grupo 50 % SRF fue similar a la de las vacas tratadas con 100 % SRF en los días 4 (día de la inyección Folltropin V), 5 y 6, pero menor en los días 7 y 8, y mayor en los días 10 y 11, lo que sugiere que varios folículos no alcanzaron un tamaño ovulatorio y no ovularon después del estro. Especulamos que una inyección adicional de Folltropin-V en la preparación del 50 %, 48 horas después de iniciar el tratamiento, podría estimular los folículos para continuar su crecimiento a un tamaño ovulatorio, como ocurrió en el grupo 100 % SRF. En tres estudios con 54 superovulaciones en vacas Simmental, Brangus y Angus, dos inyecciones intramusculares de Folltropin-V en 50 % SRF con 48 horas de diferencia indujo una respuesta superovulatoria y un número de embriones que no se diferenciaron de los obtenidos con los tratamientos de dos inyecciones por día, durante 4 días. Además, el número de folículos de tamaño ovulatorio en el día de la inseminación, no difirió entre los grupos. La solución al 50 % SRF fue mucho más fácil de mezclar con Folltropin-V que el SRF 100% utilizado anteriormente, pero todavía tardó algún tiempo para que se mezclara bien. Especulamos que una preparación aún más diluida de la SRF también podría ser eficaz en un protocolo de dos inyecciones intramusculares (Tratamiento "Split").

Por lo tanto, se diseñó un experimento (Bó et al., 2011) para comparar el Tratamiento Split de Folltropin-V diluido en 25 % o 50 % SRF, de dos inyecciones por día durante 4 días. Vacas de carne (17 Angus y 12 Simmental) fueron asignadas aleatoriamente a uno de los tres grupos de tratamiento para ser superestimadas tres veces en un diseño cross-over. En el Día 0 (momento al azar del ciclo estral), las vacas recibieron un dispositivo intravaginal Cue-Mate y una inyección intramuscular de 5 mg de estradiol-17 β y 50 mg de progesterona para sincronizar la emergencia de onda folicular. El Día 4, se iniciaron los tratamientos superestimatorios. Se realizó la dilución de Folltropin-V con 20 ml de solución salina para las vacas en el grupo control o 10 ml de MAP-5 (50 MG; 5 mg/ml) o MAP-5 (10 mg/ml; Bioniche Animal Health) para las vacas de los tratamientos Split. Todas las vacas recibieron una dosis total de 300 mg Folltropin-V dividido en inyecciones intramusculares dos veces al día durante 4 días (Control), o como una inyección intramuscular de 200 mg (es decir, el 67% de la dosis total) el Día 4 y 100 mg Folltropin-V (es decir, el 33% de la dosis total) el Día 6. Se inyectó PGF_{2 α} en el Día 6 AM y PM y los Cue-Mates fueron retirados en el Día 7 AM. Las vacas recibieron 12,5 mg Lutropin-V en el Día 8 AM y fueron inseminadas en el Día 8 PM y 9 AM. Aunque el número total estructuras (ovocitos y embriones) obtenido fue superior ($P < 0,05$) en las vacas tratadas con los Tratamientos Split (MAP-5 (50 MG): $14,3 \pm 2,1$ y MAP-5: $14,4 \pm 2,0$) que en las del Grupo Control ($10,2 \pm 1,8$), no hubo diferencias significativas entre los grupos en el número de óvulos fertilizados y embriones transferibles (Grupo control: $6,7 \pm 1,3$ y $4,0 \pm 0,8$), Grupo MAP-5 (50 MG; $9,3 \pm 1,9$ y $6,1 \pm 1,3$) y Grupo MAP-5 ($8,9 \pm 1,4$ y $5,0 \pm 0,9$). Los datos fueron interpretados para sugerir que el tratamiento Split de Folltropin-V diluido en MAP-5 resulta en una respuesta superovulatoria comparable a la del protocolo tradicional de dos inyecciones intramusculares por día, durante cuatro días.

Conclusiones

La incorporación de los protocolos que controlan la dinámica folicular y la ovulación ofrecen la ventaja de poder programar los tratamientos rápidamente y en momentos predeterminados, sin la necesidad de detectar los celos de las vacas. Estos tratamientos son prácticos y fáciles de realizar por el personal de campo, y lo más importante es que no dependen de la pericia y exactitud en la observación de celos.

Para sincronizar el desarrollo folicular en donantes de embriones el estradiol ha probado ser el más útil para cumplir con los objetivos. Sin embargo, está siendo retirado de muchos lugares alrededor del mundo. Aunque la administración de GnRH para sincronizar la emergencia de la onda folicular parece ser demasiado variable para superestimación, la pre-sincronización mejora las respuestas y se puede de esta manera superestimar a las donantes en el momento de emergencia de la primera onda folicular (en el día de la ovulación), con resultados similares a los que se obtienen utilizando estradiol. Con respecto a los tratamientos con FSH, los trabajos más recientes resumidos en esta revisión han demostrado que es posible superestimar donantes con la administración de dos inyecciones intramusculares de FSH diluida en una solución de liberación lenta.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los estudiantes y técnicos del Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) y la provisión de las hormonas a Bioniche Animal Health (Canadá).

Referencias Bibliográficas

- Adams, G.P., Nasser, L.F., Bó, G.A., García, A., Del Campo, M.R. and Mapletoft, R.J. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* 42: 1103-1113.
- Baruselli, P.S., Sá Filho, M., Matins, C.M., Naser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., and Bó, G.A. 2006. Superovulation and embryo transfer in Bos Indicus cattle. *Theriogenology* 65: 77-88
- Beal, W.B. 1999. Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. *18th Annual Convention AETA*, Colorado Springs, CO, USA, pp. 66-77.
- Bellows, R.A., Anderson, D.C., and Short, R.E. 1969. Dose-response relationships in synchronized beef heifers treated with follicle stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* 28: 638-644.
- Bergfelt, D.R., Lightfoot, K.C., and Adams, G.P. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42: 895-907.
- Bergfelt, D.R., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., and Adams, G.P. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 49: 1-12.
- Bó, G.A., Hockley, D.K., Tríbulo, H., Jofre, F., Tríbulo, R., Busso, N., Barth, A.D. and Mapletoft, R.J. 1991. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology* 35: 186 (Abstract).

- Bó, G.A., Hockley, D.K., Nasser, L.F., and Mapletoft, R.J. 1994a. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42: 963-975.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Caccia, M., Tribulo, H. and Mapletoft, R.J. 1994b. Follicular wave dynamics after estradiol 17- β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41: 1555-1569.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Person, R.A. and Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 193-204.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., and Mapletoft, R.J. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 45: 897-910.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H., and Mapletoft, R.J. 2002a. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53-72.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P., and Martins, C.M. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65: 89-101.
- Bó, G.A., Carballo Guerrero, D., and Adams, G.P. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69: 81-87.
- Bó, G.A., Tribulo, A., Ramos, M., Tribulo, H., Tribulo, R., Rogan, D., Mapletoft, R.J. 2011. Superovulation of beef cattle with a split-single dose of Folltropin-V in a slow release formulation. CETA/ACTE Newsletter//Bulletin.Spring//Printemps, pp. 12.
- Brogliatti, G., Bó, G.A., Alísio, L., Martinez, M., Palasz, A. and Mapletoft, R.J. 1996. Efecto de la dosis y la vía de administración de Folltropin en la superestimulación de vacas Holstein. *II Simposio Internacional de Reproducción Animal*, 31 oct. – 2 nov. Carlos Paz, Córdoba, Argentina. pp. 248. (Abstract)
- Bungartz, L., and Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.* 101, 583-591.
- Carballo Guerrero, D., Tribulo, A., Tribulo R., Tribulo, H., and Bó G.A. 2008a Superstimulation in the first follicular wave, whitout the use of estradiol in bonsmara cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 226 abstract.
- Carballo Guerrero, D., Tribulo, A., Tribulo R., Tribulo, H., Mapletoft R.J., and Bó G.A. 2008b. Efeito do protocolo de pré-sincronização na resposta superovulatória na primeira onda folicular em doadoras brangus. *Acta Scientiae Veterinariae* 36 (Supl 2): 631 (Abstract).
- Carballo Guerrero, D., Tribulo, A., Tribulo R., Tribulo, H., and Bó, G.A. 2009. Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. *Reprod. Fertil. Dev.* 21: 242-243.
- Carballo Guerrero, D., Tribulo, A., Tribulo R., Tribulo, H., and Bó, G.A. 2010. Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 358.
- Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Small, J.A., Wilde, R.E., Ward, D.R., and Mapletoft, R.J. 2007a. Ovarian follicular dynamics, CL function, estrus, ovulation, and fertility in beef cattle resincronized with progestins and ECP, GnRH or progesterone. *Can Vet J.* 48: 49-56.
- Colazo, M.G., Ambrose, D.J., and Mapletoft, R.J. 2007b. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. *J Dairy Sci.* 90: 328. Abstract.
- Demoustier, J.M., Beckers, J.F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J., and Ectors, F.R. 1988. Determination of porcine plasma Folltropin-V levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology* 30: 379-386.
- Deyo, C.D., Colazo, M.G., Martínez, M.F., and Mapletoft, R.J. 2001. The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology* 55: 513 (Abstract).
- Edwards, L.M., Rahe, C.H., Griffin, J.L., Wolfe, D.F., Marple, D.N., and Cummins, K.A. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 28: 291-9.
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P. and Knopf, L. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J. Reprod Fertil.* 87: 223-230.
- González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994a. Increased ovulation rates in PMSG-Stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* 41: 1631-1642
- González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994b. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotropin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J.* 35: 158-162
- Hill, B.R. and Kuehner, L.F. 1996. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle. *Theriogenology* 43: 324. Abstract.
- Hockley D.K., Bó G.A., Palasz A.T., Del Campo, M.R., Mapletoft R.J. 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: Effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 37: 224 abstract.
- Kim, H.I., Son, D.S., Yeon, H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S., Lee, H.J., and Yoon, J.T. 2001. Effect of dominant follicle removal before superovulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55: 937-945.

- Lane, E.A., Austin, E.J., and Crowe, M.A. 2008. Oestrous synchronisation in cattle-Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 1-16.
- Laster, D.B. 1972. Disappearance of and uptake of (125I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fertil.* 30, 407-415.
- Lindsell, C.E., Murphy, B.D. and Mapletoft, R.J. 1986. Superovulatory endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 26: 209-219.
- Looney, C.R., Boutle, B.W., Archibald, L.F. and Godke, R.A. 1981. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology* 15: 13-22.
- Lovie, M., García, A., Hackett, A. and Mapletoft, R.J. 1994. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to follitropin in Holstein cows. *Theriogenology* 41: 241.
- Macmillan, K.L. and Thatcher, W.W. 1991. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45: 883-889.
- Mapletoft, R.J., Bó, G.A., and Murphy, B.D. 1991. The effect of biological activity of gonadotropins on superovulation in the cow. *Proc IX Congresso Brasileiro de Reproducao Animal*, pp. 74-92.
- Mapletoft, R.J. and Pierson, R.A. 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsletter* 11: 14-24.
- Mapletoft, R.J., Bó, G.A. and Adams, G.P. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 28 pp. 23-48.
- Martinez, M.F., Adams, G.P., Bergfelt, D., Kastelic, J.P. and Mapletoft, R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in weifers. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 23-33.
- Menchaca, A., Pinczak, A., Rubianes, E. 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58: 1713-1721.
- Monniaux, D., Chupin, D. and Saumande, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19, 55-81.
- Murphy, B.D., and Martinuk, D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews* 12: 27-44.
- Nasser, L., Adams, G.P., Bó, G.A. and Mapletoft, R.J. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40: 713-724.
- Nasser, L.F., Bó, G.A., Reis, E.L., Menegati, J.A., Marques, M.O., Mapletoft, R.J. and Baruselli, P.S. 2003. Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 59: 530 (Abstract).
- Nasser, L.F., Sá Filho, M.F., Reis E.L., Rezende, C.R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors, 18 April 2011. *Theriogenology* 76: 320-327.
- Pursley, J.R., Mee, M.O. and Wiltbank, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $_{2\alpha}$ and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- Ribadu, A.Y., Nakada, K., Moriyoshi, M., Zhang, W.C., Tanaka, Y. and Nakao, T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 64, 21-31.
- Rogan D., Tríbulo A., Tríbulo H, Tríbulo R., Carballo D., Tríbulo P., Mapletoft, R.J. and Bó, G. A. 2010. Dose titration for superstimulation of Brangus and Bonsmara donors with Follitropin-V by a single intramuscular injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 365pp.
- Schams, D., Menzer, D., Schalenberger, E., Hoffman, B., Hahn, J., y Hahn, R. 1977. Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: *Control of Reproduction in the Cow*. Sreenan J.M. (ed.), Martinus Nijhoff: The Hague, pp.122-142.
- Small, J.A., Colazo, M.G., Kastelic, J.P. and Mapletoft, R.J. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71: 698-706.
- Stoebel, D.P. and Moberg, G.P. 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 65:92-6.
- Steel, R.G. and Hasler J.F. 2009. Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 21: 246.
- Sutherland, W. 1991. Biomaterials – Novel material from biological sources. Ed. by Byrom, D. Published by Stockton Press, pp. 307-333.
- Tríbulo A., Tríbulo H, Tríbulo R., Carballo D., Tríbulo P., Rogan D., Mapletoft R.J. and Bó G. A. 2010. Superstimulation of Angus donors with a single intramuscular injection of Follitropin-V. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 367pp.
- Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.F. and Boland, M.P. 1993. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology* 40: 313-321.
- Wock, J.M., Lyle, L.M. and Hockett, M.E. 2008. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17 β at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 228 (Abstract).